

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

日本国特許庁

01.09.00

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 20 OCT 2000

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 8月13日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第229509号

出願人

Applicant(s):

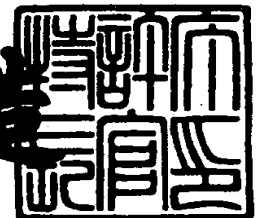
サントリー株式会社

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月 6日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3080778

【書類名】 特許願

【整理番号】 994032

【提出日】 平成11年 8月13日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【国際特許分類】 C12N 1/14

【発明の名称】 脂質を菌体外に分泌する微生物ならびに当該微生物を用いた脂質および脂質含有組成物の製造方法

【請求項の数】 24

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町山崎 1-9-5-1006

【氏名】 秋元 健吾

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府高槻市真上町 6-11-1-113

【氏名】 河島 洋

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市右京区常盤山下町 6-9

【氏名】 清水 昌

【特許出願人】

【識別番号】 000001904

【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代理人】

【識別番号】 100077517

【弁理士】

【氏名又は名称】 石田 敬

【電話番号】 03-5470-1900

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871

【弁理士】

【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9718791

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 脂質を菌体外に分泌する微生物ならびに当該微生物を用いた脂質および脂質含有組成物の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸を有する脂質を菌体外に分泌する特徴を有する微生物。

【請求項 2】 上記微生物が、糸状菌である請求項 1 記載の微生物。

【請求項 3】 上記微生物が、モルティエセラ属に属する微生物である請求項 2 記載の微生物。

【請求項 4】 上記微生物が、モルティエセラ属モルティエセラ亜属に属する微生物である請求項 3 記載の微生物。

【請求項 5】 上記微生物が、アルピナ種に属する微生物である請求項 4 記載の微生物。

【請求項 6】 上記微生物が、固体培地上で生育させた場合にコロニーの周りに脂質を含む小胞を形成する特性及び／又は透明液体培地を用いて培養した場合に培養液が白濁する特性を有する請求項 1～5 のいずれかに記載の微生物。

【請求項 7】 上記微生物が、菌体内に炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸を有する脂質を蓄積する能力を有する微生物に変異処理を施して得られる請求項 1～6 のいずれかに記載の微生物。

【請求項 8】 上記微生物が、菌体内に炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸を有する脂質を蓄積する能力を有する微生物に変異処理を施し、得られた株から、固体培地で培養して、コロニーの周りに脂質を含む小胞で覆われる株を選抜し、続いて選抜した株をさらに透明液体培地を用いて培養した場合に培養液が白濁する株を選抜することによって選択される請求項 1～6 のいずれかに記載の微生物。

【請求項 9】 不飽和脂肪酸を有する脂質を菌体外に分泌する特徴を有する糸状菌。

【請求項 10】 上記炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸を有する脂質が、トリグリセリドを 70% 以上含有する脂質である請求項 1～9 の

いずれかに記載の微生物。

【請求項 11】 上記炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸が、アラキドン酸である請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の微生物。

【請求項 12】 上記脂質が、アラキドン酸を脂質中の全脂肪酸に対して 10 % 以上含有する請求項 11 記載の微生物。

【請求項 13】 上記請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載の微生物を液体培地中で培養し、培養ろ液から得られる脂質含有組成物。

【請求項 14】 上記請求項 13 記載の脂質含有組成物から分離精製された脂質。

【請求項 15】 上記請求項 13 記載の脂質含有組成物を添加してなる食品、化粧品又は動物飼料。

【請求項 16】 上記請求項 14 記載の脂質を添加してなる食品、化粧品、医薬品又は動物飼料。

【請求項 17】 上記請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載の微生物を、液体培地中で培養し、培養ろ液から炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸を有する脂質を含有する組成物を採取することを特徴とする、脂質含有組成物の製造方法。

【請求項 18】 上記請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載の微生物を、液体培地中で連続的に培養し、培養ろ液から連続的に炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸を有する脂質を含有する組成物を採取することを特徴とする、脂質含有組成物の製造方法。

【請求項 19】 上記請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載の微生物を、液体培地中で培養し、培養ろ液から炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸を有する脂質を含有する組成物を採取し、該組成物から炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸を有する脂質を分離精製することを特徴とする、脂質の製造方法。

【請求項 20】 透明液体培地を用い培養液が白濁することを指標に、炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸を構成脂肪酸とする脂質を菌体外に分泌する能力を有する微生物を選択することを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項 2 1】 透明液体培地を用い培養液が白濁することを指標に、不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする脂質を菌体外に分泌する能力を有する糸状菌を選択することを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項 2 2】 菌体内に炭素数 1 8 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸を有する脂質を蓄積する能力を有する微生物に変異処理を施して得られる株から、固体培地で培養してコロニーの周りが脂質を含む小胞で覆われる株を選抜することによって、該脂質を菌体外に分泌する特徴を有する変異株を選択することを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項 2 3】 菌体内に炭素数 1 8 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸を有する脂質を蓄積する能力を有する微生物に変異処理を施して得られる株から、固体培地で培養してコロニーの周りが脂質を含む小胞で覆われる株を選抜し、続いて選抜した株をさらに透明液体培地を用いて培養した場合に培養液が白濁する株を選抜することによって、該脂質を菌体外に分泌する特徴を有する変異株を選択することからなる変異株のスクリーニング方法。

【請求項 2 4】 上記変異処理が、N-メチル-N'-ニトロ-N- ニトロソグアニジン (NTG) によるものである請求項 2 2 又は 2 3 記載のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、炭素数 1 8 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸を有する脂質を菌体外に分泌する特徴を有する微生物、より具体的には炭素数 1 8 以上で二重結合数が 3 以上の高度不飽和脂肪酸を産生する能力を有する微生物に変異処理を施して得られる、炭素数 1 8 以上で二重結合数が 3 以上の高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする脂質を菌体外に分泌する能力を有する微生物、および当該微生物を利用して効率的に高度不飽和脂肪酸を含有する脂質を製造する方法、ならびに当該微生物のスクリーニング方法に関する。

【0 0 0 2】

より具体的には、アラキドン酸を産生する能力を有するモルティエレラ属に属する微生物に変異処理を施して得られる、アラキドン酸を脂肪酸組成の 1 0 % 以

上含有する脂質を菌体外に分泌する能力を有する微生物、および当該微生物を培養してアラキドン酸を脂肪酸組成の10%以上含有する含有する脂質を菌体の内部に産生させるとともに菌体外に分泌させ、これらの菌体外及び／又は菌体内のアラキドン酸含有組成物からアラキドン酸含有脂質を得ることを特徴とするアラキドン酸含有油脂の製造方法、ならびに当該微生物をスクリーニングする方法に関する。

【0003】

【従来の技術】

近年、高度不飽和脂肪酸の持つさまざまな生理活性が注目を集めるようになってきている。例えば、アラキドン酸は、子宮収縮・弛緩作用、血管拡張、血圧降下作用等お生理活性を有するプロスタグランジン、トロンボキサン、プロスタサイクリン、ロイコトリエン等の前駆体物質といわれているが、近年、特に乳幼児の発育に必要な成分として、ドコサヘキサエン酸とともに急速に研究が進められている。そして、アラキドン酸やドコサヘキサエン酸の他、 γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、エイコサペンタエン酸などの高度不飽和脂肪酸を含有する脂質を添加した各種の食品、化粧品及び動物飼料が注目を集め、一部これらの高度不飽和脂肪酸を添加した商品も商品化されている。

【0004】

これに伴って、これら高度不飽和脂肪酸を効率的に生産する方法についても精力的に研究されるようになってきている。

例えば、アラキドン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、エイコサペンタエン酸などの高度不飽和脂肪酸を産生する微生物と知られているモルティエレラ属、特にモルティエレラ亜属に属する微生物を用いて発酵法によりアラキドン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、 γ -リノレン酸又はエイコサペンタエン酸を効率よく製造する方法が開発されている（特開昭63-44891、特開昭63-12290、特開昭63-14696、特開平5-91887、特開昭63-14697）。さらにモルティエレラ属モルティエレラ亜属の属する微生物に変異処理を施して得られる、 $\Delta 12$ 不飽和化酵素が低下又は欠失している変異株を用いてミード酸を製造する方法も知られている（特開平5-91888）。

【0005】

このように、高度不飽和脂肪酸を含む脂質を産生する微生物を用いた該脂質の製造が、不飽和脂肪酸の供給源として主流になりつつある。これらの微生物は、
 産生する高度不飽和脂肪酸を細胞膜の構成成分とするだけではなく、高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする脂質として菌体内に蓄積するという特徴を持っている。そして、この菌体内に蓄積した脂質を利用することによって、高度不飽和脂肪酸の高い生産性が確保できるようになってきた。

【0006】

この従来の製造方法の場合、1回の培養で得られる脂質の量は、培養で得られる微生物の菌体量と菌体当たりの脂質の産生量の積となり、より多くの脂質を生産するには、菌体量をいかに増やしかつ菌体当たりの脂質産生量をいかに増加させるかが課題であった。そしてこれまでの研究により、培養条件によってこの両方ある程度は増加させることができることが明らかになっているが、菌体量は培養装置の容積など物理的な要因によって、また、菌体当たりのトリグリセリドの量は用いる微生物の生理的な要因によって、各々一定の限界がある。

【0007】

一方、微生物が産生し菌体内に蓄積した脂質を利用しようとする場合は、微生物を培養した後に菌体のみを集め、これらをミル等によって処理して菌の細胞膜を破壊してから菌体内に蓄積した脂質を抽出することが必要である。

微生物の産生物を菌体内に蓄積させるのではなく、菌体外に分泌させることができれば、産生された物質が微生物に生理的な負荷を与えることは軽減され、微生物は産生物を作り続けることができる。また、微生物の産生物を単離、抽出する場合も、培養液からの抽出で済むため、処理が容易になるだけでなく、微生物を生かしたままで連続的に処理できるという利点がある。

【0008】

こうしたことから、近年、菌体内に蓄積する油脂を菌外に分泌する試みが福井作蔵らによりなされている(BIO INDUSTRY 12, 36-46 (1995))。福井作蔵らは化石燃料に代わる新規バイオ燃料を開発するために、微生物による脂質の分泌生産の研究を行い、Trichosp r n属酵母の育種により糖並びにn-アルカンを油脂に

変換し菌体外に分泌することに成功している。そして、菌体外への分泌したトリグリセリドの構成脂肪酸分子種はオレイン酸、パルミチン酸、リノール酸、ステアリン酸であることを明らかにしている。

【0009】

しかし、炭素数18以上で二重結合数が3以上の高度不飽和脂肪酸を産生する能力を有する微生物において、産生した炭素数18以上で二重結合数が3以上の高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする脂質を菌体外に分泌させる微生物は全く知られていなかった。

また「微生物産生脂肪酸とその利用」鈴木修、フレグランスジャーナル1989-6 P67-75 には、カビによるγ-リノレン酸生産の研究で、*Mucor* 属の培養培地に界面活性剤を加えて一部脂質を菌体外に漏出させることが報告されている。しかし、これは人為的に菌体の細胞膜を壊す処理を行って、菌体内に蓄積した脂質を漏出させる方法に関するものであって、菌自体による菌体内で生産した脂質を菌体外に分泌する能力を利用しようというものではない。

【0010】

したがって、炭素数18以上で二重結合数が3以上の高度不飽和脂肪酸を産生する能力を有する微生物において、産生した高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする脂質を菌体外に分泌する特徴を有する微生物を見出し、当該微生物を用いて高度不飽和脂肪酸を含有する脂質を効率よく製造する方法の開発が望まれている。ところで、新たな能力を有する微生物を見出すためには、そうした能力を有する微生物の効率なスクリーニングの方法の開発が欠かせない。上記の糖並びにn-アルカンを油脂に変換し菌体外に分泌する *Trichosporon* 属酵母の育種の場合には、次のようなスクリーニング方法が採られている。

【0011】

即ち、寒天平板培地 (YPD 培地など) に出現した酵母コロニーを、紫外線処理 (15ワット、距離30 cm、時間15分) (この処理は、次の重層処理におけるコロニー細胞の分散を抑止するためのもので、変異誘導のための処理ではない) し、紫外線処理済みコロニー平板に、検定菌株数105個を含むYPD 軟寒天培地を重層し、28℃で2日間培養する。検定菌株にはそれぞれ飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の

栄養要求性を有するA-1 株と 1e-1 株を用い、コロニーの周りに大きいハロー（検定菌のマイクロコロニー環）を与えるコロニーを脂質分泌株として選抜する。脂質分泌株の選択には、軟寒天培地にリパーゼを含ませたもの、含ませてないものの2つを用いる。

【0012】

この方法は、重層処理が可能な酵母には適用できるが、重層処理が不可能な微生物のスクリーニングには用いることができないという大きな欠点がある。また、検定方法が煩雑になるという欠点もある。

従って、炭素数18以上で二重結合数が3以上の高度不飽和脂肪酸を産生する能力を有する微生物において、産生した高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする脂質を菌体外に分泌する特徴を有する微生物を見出すためには、当該微生物を簡便な方法で効率的にスクリーニングでき、かつ種々の微生物に適用可能なスクリーニング方法の開発が望まれている。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】

従って本発明は、炭素数18以上で二重結合数が3以上の高度不飽和脂肪酸を産生する能力を有する微生物において、産生した炭素数18以上で二重結合数が3以上の高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする脂質を菌体外に分泌する特徴を有する微生物、および当該微生物をスクリーニングする方法を提供しようとするものである。さらに、本発明はまた、当該微生物を用いて高度不飽和脂肪酸を含有する脂質を効率よく製造する方法を提供しようとするものである。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記の目的を達成するために鋭意研究した結果、炭素数18以上で二重結合数が3以上の高度不飽和脂肪酸を産生する能力を有する微生物に変異処理を施すことにより、炭素数18以上で二重結合数が3以上の高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする脂質を菌体外に分泌する能力を有する微生物を作出することができることを見出した。

【0015】

また、変異処理を施した微生物群から、目的とする能力を有する微生物を得るためには、NTG 処理法や紫外線処理法などの通常の方法で変異処理を行った後に、当業者であれば容易に実施できる次のような簡便なスクリーニング方法を見出した。即ち、一次スクリーニングとして、変異処理が施された変異株を固体培地上で生育させた場合にコロニーの周りに小胞 (lipid ball) が存在する菌株を選抜する。続いて二次スクリーニングとして、一次スクリーニングで選抜した株を透明な液体培地 (4%グルコース、1%酵母エキス pH6.0) 中で28℃で2日間振盪培養する。菌体内に脂質を蓄積する微生物であれば、培養中に培地が白濁することはないが、菌体外に脂質を分泌していれば培地が白濁するため、脂質を菌体外に分泌する能力を有する微生物は、培養液の白濁の程度を目視で確認するだけで容易にスクリーニングすることができる。

【0016】

そして、得られた微生物を利用して、炭素数18以上で二重結合数が3以上の高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする脂質を効率的に菌体外に分泌させるためには、グルコース濃度を高めた培地及び／又はpHを高めた培地で培養すれば良いことを見出した。

さらに、菌体外に分泌された炭素数18以上で二重結合数が3以上の高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする脂質または脂質を含有する組成物を培養液から単離するには、通常の有機溶媒を用いた抽出方法の他、遠心分離やクロマトグラフィー法が使えることを見出した。

【0017】

さらにまた、培養液から単離・精製した炭素数18以上で二重結合数が3以上の高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする脂質を含有する組成物は水又は親水性物質に分散しやすいという特徴を持っているため、この脂質を含有する組成物を、そのまま食品や化粧品または動物飼料に添加すれば、これまでに無い特徴を持った高度不飽和脂肪酸を含有する食品や化粧品または動物飼料が得られることを見出し、本発明を完成した。

【0018】

【発明の実施の形態】

本発明において、炭素数が 18 以上で、かつ二重結合数が 3 以上であるの脂肪酸とは、例えば、5, 8, 11, 14- エイコサテトラエン酸（アラキドン酸）、8, 11, 14-エイコサトリエン酸（ジホモ- γ - リノレン酸）、6, 9, 12- オクタデカトリエン酸（ γ - リノレン酸）、5, 8, 11, 14, 17- エイコサペンタエン酸、8, 11, 14, 17-エイコサテトラエン酸、6, 9, 12, 15- オクタデカテトラエン酸（ステアリドン酸）、9, 12, 15-オクタデカトリエン酸（ α - リノレン酸）、4, 7, 10, 13, 16, 19- ドコサヘキサエン酸（DHA）、5, 8, 11- エイコサトリエン酸（ミード酸）、7, 10, 13, 16-ドコサテトラエン酸、4, 7, 10, 13, 16- ドコサペンタエン酸、7, 10, 13, 16, 19-ドコサペンタエン酸等を挙げることができる。

【0019】

本発明は、炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸を有する脂質を菌体外に分泌する特徴を有する微生物、又は不飽和脂肪酸を有する脂質を菌体外に分泌する特徴を有する糸状菌、さらに具体的には、菌体内に炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸を有する脂質を蓄積する能力を有する微生物、又は不飽和脂肪酸を有する脂質を菌体外に分泌する特徴を有する糸状菌を、変異処理により、菌体内で生産された脂質を菌体外に分泌することのできる微生物を与える。

【0020】

ここで菌体内に炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸を有する脂質を蓄積する能力を有する微生物とは、具体的には従来から知られている γ - リノレン酸生産能を有する微生物やアラキドン酸生産能を有する微生物、DHA 生産能を有する微生物、オメガ 9 系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物等が挙げられ、アラキドン酸生産能を有する微生物としては、モルティエレラ (Mortierella) 属、コニディオボラス (Conidiobolus) 属、フィチウム (Pythium) 属、フィトフトラ (Phytophthora) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、クロドスポリウム (Cladosporium) 属、ムコール (Mucor) 属、フザリウム (Fusarium) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属、ロードトルラ (Rhizoglyphus) 属、エントモフトラ (Entomophthora) 属、エキノスポランジウム (Echinosporella) 属、

angium) 属、サプロレグニア (Sapr legnia) 属に属する微生物を挙げることができる。

【0021】

モルティエレラ (Mortierella) 属モルティエレラ (Mortierella) 亜属に属する微生物では、例えばモルティエレラ・エロンガタ (Mortierella elongata)、モルティエレラ・エキシグア (Mortierella exigua)、モルティエレラ・フィグロフィラ (Mortierella hygrophila)、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina)、モルティエレラ・シュマツカリ (Mortierella schmuckeri)、モルティエレラ・ミヌティシマ (Mortierella minutissima) 等を挙げることができる。

【0022】

具体的にはモルティエレラ・エロンガタ (Mortierella elongata) IF08570、モルティエレラ・エキシグア (Mortierella exigua) IF08571、モルティエレラ・フィグロフィラ (Mortierella hygrophila) IF05941、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) IF08568、ATCC16266、ATCC32221、ATCC42430、CBS219.35、CBS224.37、CBS250.53、CBS343.66、CBS527.72、CBS529.72、CBS608.70、CBS754.68 等の菌株を挙げることができる。

【0023】

これらの菌株はいずれも、大阪市の財団法人醗酵研究所 (IFO)、及び米国のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection, ATCC) 及び、Centrralbureau voor Schimmelcultures (CBS) からなんら制限なく入手することができる。また本発明者が土壌から分離した菌株モルティエレラ・エロンガタ SAM0219 (微工研菌寄第8703号) (微工研条寄第1239号) を使用することもできる。これらのタイプカルチャーに属する菌株、あるいは自然界から分離した菌株をそのまま用いることができるが、増殖及び／又は単離を1回以上行うことによって得られる元の菌株とは性質の異なる自然突然変異株を用いることもできる。

【0024】

上記微生物に施される変異処理としては、放射線 (X線、ガンマー線、中性子

線) 照射や紫外線照射、高熱処理等を行ったり、また微生物を適当なバッファー中などに懸濁し、変異原を加えて一定時間インキュベート後、適当に希釈して寒天培地に植菌し、変異株のコロニーを得るといった一般的な突然変異操作を行うこともできる。

【0025】

変異原としては、ナイトロジェンマスタード、メチルメタンサルホネート (MM S) やN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 等にアルキル化剤、5-ブロモウラシル等の塩基類似体、マイトマイシンC等の抗生物質、6-メルカプトプリン等の塩基合成阻害剤、プロフラビン等の色素類、4-ニトロキノリン-N-オキシド等のある種の発がん剤、塩化マンガン、ホルムアルデヒド等の化合物を挙げることができる。また、使用する微生物は、生育菌体(菌糸)でも良いし、胞子でも良い。

【0026】

このように変異処理を施された微生物は、以下の方法により目的とする変異株を分離することができる。一次スクリーニングとして変異処理が施された変異株を固体培地上に塗布し、コロニーのまわりに小胞 (Lipid ball) が存在することを目安に菌株を選択し、二次スクリーニングとして、一次スクリーニングで選択した菌株が菌体外に脂質を分泌するかどうかを液体培養で評価する。評価方法は、例えば、透明な液体培地 (4%グルコース、1%酵母エキス pH6.0) 4mlを試験管に入れ、120℃で20分間殺菌した後、一次スクリーニングで選択した菌株を白金耳植菌し、28℃で2日間振盪培養する。

【0027】

モルティエレラ属モルティエレラ亜属に属する微生物など菌体内に不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とするトリアシルグリセロールを蓄積しても菌体外にそれを分泌しない微生物は、前記培地で培養しても培地が濁ることはないが、菌体外に脂質を分泌していれば培地が濁ることから、菌体外に脂質を分泌している菌は容易に確認することができる。二次スクリーニングに使用する培地の成分は透明な液体培地とすることができるものであれば適宜選択することができ、培地組成も評価する微生物の生育に適した組成を適宜選択すれば良い。

【0028】

なおこのようにして得られた株の中から、生育能や脂質生産能が親株と同様又はそれ以上の株を選択することが好ましい。また選抜にかける微生物によっては上記一次スクリーニングあるいは上記二次スクリーニングだけでも目的とする株を選抜することが可能であるが、両者を組み合わせることによって、より確実に選抜することができる。また上記2つのスクリーニング法を組み合わせる場合、上記一次スクリーニングが先であっても上記二次スクリーニングが先であってもよい。

【0029】

上記の方法によって得られた変異株として、例えばアラキドン酸生産能を有するモルティエレラ・アルピナIF08568 から本発明者らが誘導した菌体内に蓄積した脂質を菌体外に分泌するモルティエレラ・アルピナSAM 2241又はSAM 2242を使用することができるが、この菌株に限定しているわけではなく、菌体内で生産された脂質を菌体外に分泌する菌株をすべて使用することができる。

【0030】

本発明において例えば以下の方法により、本発明の炭素数18以上で二重結合数が3以上である脂肪酸を有する脂質を菌体外に分泌する特徴を有する微生物から、菌体外に分泌された脂質を得ることができる。まず上記本発明の微生物の培養において、本発明の微生物を培養する為には、その菌株の孢子、菌糸、又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地に接種し培養する。

【0031】

液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一般的に使用されているものが、いずれも使用できるが、これらに限られるものではない。窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンステープリカー、大豆タンパク、脱脂ダイズ、綿実カス等の天然窒素源の他に、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源を用いることができる。

【0032】

この他必要に応じリン酸塩、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅等の無機塩及びビタミン等も微量栄養源として使用できる。これらの培地成分は微生物の生育を害しない濃度であれば特に制限はない。実用上一般に、炭素源は0.1～40重量%、好ましくは1～25重量%の濃度するのが良い。さらに、炭素源を逐次添加することで培養中に炭素源の枯渇を防ぐ及び／又は初発炭素源濃度を高くすることで菌体外への脂質分泌を促進することができる。又、初発の窒素源添加量は0.1～10重量%、好ましくは0.1～6重量%とし、培養途中に窒素源を流加しても構わない。

【0033】

本発明の変異株の培養温度は使用する微生物によりことなるが、5～40℃、好ましくは20～30℃とし、また20～30℃にて培養して菌体を増殖せしめた後5～20℃にて培養を続けて不飽和脂肪酸を生産せしめることもできる。このような温度管理により、生成脂肪酸中の高度不飽和脂肪酸の生成量を上昇せしめることができる。培地のpHは4～10、好ましくは5～9として通気攪拌培養、振盪培養、バイオリアクタによる連続培養又は静置培養を行う。なお、初発pHを6.0以上にすることで菌体外への脂質分泌を促進することができる。培養は通常2～30日間、好ましくは5～20日間、より好ましくは5～15日間行う。

【0034】

本発明においては、菌体内で生産した炭素数18以上で二重結合数が3以上である脂肪酸を有する脂質を菌体外に分泌する微生物を培養する培地中に、炭素数18以上で二重結合数が3以上である脂肪酸の前駆体を添加して培養することにより、該脂肪酸、例えば5, 8, 11, 14-エイコサテトラエン酸（アラキドン酸）、8, 11, 14-エイコサトリエン酸（ジホモ- γ -リノレン酸）、6, 9, 12-オクタデカトリエン酸（ γ -リノレン酸）、5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸、8, 11, 14, 17-エイコサテトラエン酸、6, 9, 12, 15-オクタデカテトラエン酸（ステアリドン酸）、9, 12, 15-オクタデカトリエン酸（ α -リノレン酸）の産生を促進することもできる。

【0035】

前駆体としては例えば、テトラデカン、ヘキサデカン、オクタデカン等の炭化水素、テトラデカン酸、ヘキサデカン酸、オクタデカン酸等の脂肪酸又はその塩（例えばナトリウム塩、カリウム塩等）及びエステル、又は脂肪酸が構成成分として含まれる油脂（例えば、オリーブ油、ヤシ油、パーム油、亜麻仁油、魚油、微生物油脂）等を挙げることができるが、これらに限られるものではない。

【0036】

また炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸や該脂肪酸を構成成分として含まれる油脂（例えば魚油、微生物油脂）を、培地中に添加して培養することにより、本発明の微生物が、培地に添加した脂肪酸又は油脂を菌体内に取り込み、該脂肪酸を構成脂肪酸とする脂質を含有する組成物として菌体外に分泌するため、使用する微生物が本来生産しない高度不飽和脂肪酸であっても、このような高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする脂質を含有する組成物を製造することが可能である。

【0037】

上記前駆体を含むこれらの基質の総添加量は培地に対して 0.001～10 重量%、好ましくは 0.5～10 重量% である。これらの基質は生産微生物を接種する前又はその直後に加えてもよく、又は培養を開始した後に加えてもよく、あるいは両時点で加えてもよい。培養開始後の添加は 1 回でもよく、又は複数回に分けて間欠的に添加してもよい。あるいは、連続的に添加することもできる。又、これらの基質を唯一の炭素源として培養してもよい。

【0038】

このようにして培養して、炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸を大量に含有する脂質が菌体内に蓄積され該脂質を含有する組成物が菌体外に分泌される。液体培地を使用した場合には、培養物から培養菌体を取り除いた培養液から、例えば、次のようにして炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸を有する脂質を含む組成物の採取を行う。

【0039】

培養終了後、培養物から遠心分離及び濾過等の常用の固液分離手段により培養菌体を取り除き、炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸を有する脂

質を含む組成物を含む培地（培養液と言う）を得る。この培養液から、炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸を有する脂質を含む組成物は、凍結乾燥により培地成分を含むものとして単離することもできるし、常法の遠心分離やカラム処理により培地成分を含まない組成物として単離することもできる。

【0040】

そして、このようにして得られた組成物から脂質を抽出する方法については、菌体から脂質を抽出する方法と同様にして実施することができる。すなわち該組成物を、窒素気流下で有機溶媒によって抽出処理する。有機溶媒としてはエーテル、ヘキサン、メタノール、エタノール、クロロホルム、ジクロロメタン、石油エーテル等を用いることができ、又メタノールと石油エーテルの交互抽出やクロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いた抽出によっても良好な結果を得ることができる。抽出物から減圧下で有機溶媒を留去することにより、炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸を含有する脂質が得られる。

【0041】

上記のようにして得られた脂質中には、炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸が脂質化合物、例えば脂肪の構成成分として含まれている。これらを直接分離することもできるが、低級アルコールとのエステル、例えば γ -リノレン酸メチル、ジホモ- γ -リノレン酸メチル、アラキドン酸メチル、エイコサペンタエン酸メチル等として分離するのが好ましい。

【0042】

このようなエステルにすることにより、他の脂質成分から容易に分離することができ、また、培養中に生成する他の脂肪酸、例えばパルミチン酸、オレイン酸等（これらも、高度不飽和脂肪酸のエステル化に際してエステル化される）から容易に分離することができる。例えば、本発明の脂肪酸のメチルエステルを得るには、前記の抽出脂質を無水メタノール-塩酸 5~10%、 BF_3 -メタノール 10~50%等により、室温にて 1~24 時間処理するのが好ましい。

【0043】

前記の処理液から本発明の脂肪酸メチルエステルを回収するにはヘキサン、エーテル、酢酸エチル等の有機溶媒で抽出するのが好ましい。次に、この抽出液を

無水硫酸ナトリウム等により乾燥し、有機溶媒を好ましくは減圧下で留去することにより主として脂肪酸エステルからなる混合物が得られる。この混合物には、目的とする本発明の脂肪酸メチルエステルの他に、パルミチン酸メチルエステル、ステアリン酸メチルエステル、オレイン酸メチルエステル等の脂肪酸メチルエステルが含まれている。これらの脂肪酸メチルエステル混合物から本発明の脂肪酸メチルエステル、例えば、アラキドン酸メチルエステルを単離するには、カラムクロマトグラフィー、低温結晶化法、尿素包接法、液々交流分配クロマトグラフィー等を単独で、又は組み合わせて使用することができる。

【0044】

こうして単離された各種高度不飽和脂肪酸メチルから脂肪酸を得るには、アルカリで加水分解した後、エーテル、酢酸エチル等の有機溶媒で抽出すればよい。

又、本発明の脂肪酸をそのメチルエステルを経ないで摂取するには、前記の抽出脂質をアルカリ分解（例えば5%水酸化ナトリウムにより室温にて2~3時間）した後、この分解液から、脂肪酸の抽出・精製に常用されている方法により抽出・精製することができる。

【0045】

上記方法によって得られる菌体外に分泌された脂質を含有する組成物は、糖質、蛋白質、脂質から構成されている。そして、糖質は0~70%、好ましくは20~60%、蛋白質は0~40%、好ましくは10~30%、脂質は20~100%、好ましくは30~80%からなる。しかしながら、糖質、蛋白質、脂質からなる組成物の割合は、培養条件により種々とりうることができ、この比率に限定されるわけではない。また、実際には水分も含まれる場合があることは当たり前である。

【0046】

また上記組成物の中の脂質はグリセリド（トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド）、リン脂質、脂肪酸、糖脂質、ステロールエステルなどから構成されている。そして、グリセリドは50~100%、好ましくは70~100%、リン脂質は0~50%、好ましくは0~30%、脂肪酸と糖脂質とステロールエステルは合わせて0~30%、好ましくは0~15%からなる。

本発明の脂質含有組成物は炭素数 18 以上で二重結合数が 3 以上である脂肪酸をトリグリセリドの形で豊富に含有しており、その用途に関しては無限の可能性があり、食品、飲料、化粧品、医薬品の原料並びに添加物として使用することができる。そして、その使用目的、使用量に関して何ら制限を受けるものではない。

【0047】

例えば、食品組成物としては、一般食品の他、機能性食品、栄養補助食品、未熟児用調製乳、乳児用調製乳、乳児用食品、妊産婦食品又は老人用食品等を挙げることができる。本発明の脂質含有組成物は、水や親水性物質に対する分散性に優れているため、従来添加することが困難であった油脂を含まない、農産食品、醗酵食品、畜産食品、水産食品、または飲料に添加することが可能となった。

【0048】

もちろん従来通り油脂を含む食品へも添加可能であり、油脂を含む食品例として、肉、魚、またはナッツ等の本来油脂を含む天然食品、スープ等の調理時に油脂を加える食品、ドーナッツ等の熱媒体として油脂を用いる食品、バター等の油脂食品、クッキー等の加工時に油脂を加える加工食品、あるいはハードビスケット等の加工仕上げ時に油脂を噴霧または塗布する食品等が挙げられる。さらに、機能性食品・医薬品の形態であっても構わなく、例えば、経腸栄養剤、粉末、顆粒、トローチ、内服液、懸濁液、乳濁液、シロップ等の加工形態であってもよい。

【0049】

【実施例】

次に、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。しかし、本発明は、実施例に限定されるものではない。

実施例 1. *Mortierella alpina* IF08568 の変異処理による脂質含有組成物を菌体外に分泌する菌株の取得

モルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) IF08568 を Czapek 寒天培地 (0.2 % NaNO_3 、0.1 % K_2HPO_4 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05% KCl 、0.01% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3 % シュークロース、2 % 寒天、pH6.0) 300ml を含む大型スラント瓶に植菌し、2 週間、28℃ で培養した。

【0050】

培養後、大型スラント瓶にTween 80を2滴加えた滅菌水50mlを加えてよく振り、4重のガーゼで濾過した。この操作を2回繰り返し、濾液を8000 x gで10分間遠心した。このようにして得られた胞子を50mM Tris/maleate 緩衝溶液 (pH7.5) で 1×10^6 /mlになるように懸濁し、胞子液を調製した。

【0051】

得られた胞子溶液1.0ml に、100mM Tris/maleate緩衝溶液 (pH7.5) 0.5ml を加え、NTG 溶液 (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン 5mg/脱イオン水 1ml) 500 μ lを加えて、28℃で15分間インキュベートして変異処理を施した。10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ を3ml加えて、反応液を5500 x gで10分間遠心し、沈殿物(変異処理が施された胞子)を滅菌水3mlで洗浄し、5500 x gで10分間遠心後、沈殿物に滅菌水を加えてNTG 処理された胞子懸濁液とした。

【0052】

NTG 処理された胞子懸濁液は、 10^{-3} ~ 10^{-4} 程度に希釈し、GY寒天プレート(1%グルコース、0.5%酵母エキス、0.005%トリトン (Triton) X-100、1.5%寒天、pH6.0)に塗布した。28℃で培養し、コロニーが出現したものの形態観察を行った結果、親株と生育形態の明らかに異なる菌株が得られた。親株を始めとする高度不飽和脂肪酸生産菌は、脂質を菌体内に蓄積するのでコロニー全体が菌糸で覆われるのに対して、今回得られた変異株はコロニーが小胞 (Lipid ball) で覆われていた。

【0053】

次いで、透明な液体培地(4%グルコース、1%酵母エキス pH6.0) 4mlを試験管に入れ、120℃で20分間殺菌した後、上記で得られた菌株を一白金耳植菌し、28℃で2日間振盪培養したところ、培地は白濁した。

GY寒天プレート上の培養で得られたコロニーを覆っていた小胞を薄層クロマトグラフィー (TLC) により脂質分析を行った。予め活性化したプレート (Merck 5554、200 x 200 x 0.25mm, silica gel 60F-254, aluminium sheet) にサンプルとコントロール(リン脂質、トリグリセリド、脂肪酸)を塗布し、n-ヘキサン:ジエチルエーテル:酢酸=80:20:2 (V/V/V) 溶液で展開し、リンモリブ

デン酸 (10% リンモリブデン酸エタノール溶液) とプリムリン (0.01% プリムリン 80% アセトン溶液) を発色剤に使用した。

【0054】

なお、プリムリンについては、長波長 (366 nm) の紫外線下でバンド観察した。その結果、菌体外に認められた小胞の主成分はトリグリセリドであることが明らかとなった。

こうして、高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とするトリグリセリドを脂質含有組成物として菌体外に分泌する変異株モルティエレラ・アルピナ SAM2241 及び SAM2242 が約3000個のコロニーから得られた。

【0055】

実施例 2. 脂質含有組成物を菌体外に分泌する菌 *Mortierella alpina* SAM2241

を種々の培地で培養した場合の、菌体外に分泌された脂質の脂肪酸分析

培地 A, B, C, D, E, F それぞれ 4 ml を試験管に入れ、120 °C で 20 分間殺菌した。実施例 1 で得たモルティエレラ・アルピナ SAM2241 を培地に一白金耳植菌し、28°C で 2 日間、その後 12°C で 7 日間振盪培養した。培養後、濾過により菌体と濾液に分別した。

【0056】

得られた濾液をネジ口試験管 (16.5mmφ) に入れ、凍結乾燥した後、塩化メチレン 1 ml、無水メタノール-塩酸 (10%) 2 ml を加え、50°C で 3 時間処理することによってメチルエステル化し、*n*-ヘキサン 4 ml、水 1 ml を加えて、2 回抽出し、抽出液の溶媒を遠心エバポレーター (40°C、1 時間) で留去した後、得られた脂肪酸メチルエステルをキャピラリーガスクロマトグラフィーで分析した。なお、メチルエステル化時に内部標準として 0.2 mg/ml の *n*-Heptadecanoic acid (17:0) を 1.0 ml 加え、GLC の面積比より脂肪酸の定量を行った。

【0057】

培地 A	Glucose	1.0%
	K ₂ HPO ₄	0.3
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.02

Polypept ne	1.5
NaCl	0.2
Yeast extract	0.1

PH 7.0

培地B	Polypeptone	1.0%
	Meat extract	0.5
	Yeast extract	0.1
	NaCl	0.5

PH 7.0

【0 0 5 8】

培地C	Glucose	5.0%
-----	---------	------

	Polypeptone	0.5
	KH_2PO_4	0.2
	K_2HPO_4	0.1
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02
	Yeast extract	0.1

PH 6.5

培地D	Glucose	2.0%
	Yeast extract	1.0
	Bacto peptone	1.0

【0 0 5 9】

培地E MRS 培地

	Glucose	2.0%
	Meat extract	1.0
	Yeast extract	0.5
	Casein tryptic digest	1.0
	K_2HPO_4	0.2
	Sodium acetate	0.5
	Diammonium citrate	0.2

MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.02
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0.02
Tween 80	0.1

【 0 0 6 0 】

培地F	Glucose	1.0%
	Yeast extract	0.5
	PH 6.5	

結果を表 1 に示す。

【 0 0 6 1 】

【表 1】

表 1 各種培地で得られた菌体外に分泌された脂質中の脂肪酸組成 (%)

	16:0	18:0	18:1 (n-9)	18:2 (n-6)	18:3 (n-6)	DGLA	AA	その他
培地A	14	8	20	11	4	4	31	8
培地B	15	6	28	16	9	-	26	-
培地C	17	14	13	10	3	2	37	4
培地D	14	9	23	9	5	2	31	7
培地E	16	3	30	11	7	2	27	4
培地F	15	5	23	10	5	3	32	7

16:0、パルミチン酸； 18:0、ステアリン酸； 18:1 (n-9)、オレイン酸； 18:2 (n-6)、リノール酸； 18:3 (n-3)、α-リノレン酸；DGLA、ジホモ-γ-リノレン酸；AA、アラキドン酸

【 0 0 6 2 】

いずれの培地においても、脂質含有組成物を菌体外に分泌することが認められ

た。さらに、培地A -F で得られた菌体外に分泌された脂質の全脂質量並びにアラキドン酸量はグルコース濃度と正の相関が認められた。即ち、試験管当たりの全脂質量は、グルコース濃度が1%の場合は0.18, 0.6 mg、グルコース濃度が2%の場合は0.53, 0.96 mg、グルコース濃度が5%の場合は2.11 mg となり、試験管当たりのアラキドン酸量は、グルコース濃度が1%の場合は0.05, 0.15 mg、グルコース濃度が2%の場合は0.11, 0.19 mg、グルコース濃度が5%の場合は0.62 mg となった。

また、変異株MAS2242 についても同様の傾向の結果が得られた。

【0063】

実施例3. 脂質含有組成物を菌体外に分泌する菌Mortierella alpina SAM2241の10Lジャーファーマンターによる通気攪拌培養におけるアラキドン酸の生産量

グルコース 2%、大豆タンパク 1.5%、 KH_2PO_4 0.3%、 Na_2SO_4 0.1%、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、大豆油 0.2% を含む培地 (A : pH 5.0、B : pH 6.0、C : pH 7.0) 5Lを10L ジャーファーマンターに入れ、120℃で30分間殺菌した。実施例1で得たモルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) SAM2241 を植菌し、通気量1.0 vvm、培養温度24℃で10日間の通気攪拌培養を行った。なお、培養1日目に2.0%グルコース、培養2日目に1.5%グルコース、培養3, 4日目に1.0%グルコース、培養5, 6日目に0.5%グルコースを添加した。

【0064】

サンプリングは毎日実施し、培養液を遠心及び／又は濾過により菌体と濾液（菌体外に分泌した脂質含有組成物を含む）に分け、菌体は105℃で2時間乾燥させ、得られた乾燥菌体20mgをネジ口試験管（16.5 mm φ）に入れ、実施例2と同様にメチルエステル化を行った。また、濾液1ml をネジ口試験管（16.5 mm φ）に入れ、凍結乾燥後、実施例2と同様にメチルエステル化を行った。得られた脂肪酸メチルエステルをキャピラリーガスクロマトグラフィーで分析した。表2に培養9日目のアラキドン酸の生産量および含有率を示す。

【0065】

【表 2】

表 2 培養 9 日目のアラキドン酸生産量及び含有率

		菌体内	菌体外	菌体外油脂 の割合(%)
培地A	pH 5.0	6.4 g/L (33.2%)	0.14 g/L (37.4%)	2.1
培地B	pH 6.0	5.8 g/L (32.4%)	0.24 g/L (34.5%)	4.0
培地C	pH 7.0	3.6 g/L (29.7%)	0.43 g/L (30.8%)	10.7

なお、カッコ内の数字は全脂肪酸に占めるアラキドン酸の割合を表す。

培地のpHの上昇に伴ってアラキドン酸含有脂質の菌体外への分泌が促進されたが、アラキドン酸の生産量は減少した。

【0066】

実施例 4. 脂質含有組成物を菌体外に分泌する菌 *Mortierella alpina* SAM2241
が産生した脂質含有組成物の脂質分析

実施例 3 で得られた培地 A, B, C で培養した培養 9 日目の培養濾液を、クロロホルム/メタノール/水 (1 : 2 : 0.8) 系による Blight-Dyer 法により処理し、菌体外に分泌された脂質含有組成物から全脂質を抽出した。

【0067】

得られた全脂質は、中性脂質（トリグリセリド）と極性脂質（リン脂質）を含んでおり、抽出した全脂質を Sep-pak Silica カートリッジ（Waters 社製）にチャージし、クロロホルム溶出により中性脂質画分、メタノール溶出により極性脂質画分を溶出し、溶剤を留去した後、実施例 2 と同様にメチルエステル化を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをキャピラリーガスクロマトグラフィーで分析した。トリグリセリドとリン脂質の結合する全脂肪酸の割合として、トリグリセリドとリン脂質の割合を算出した。結果、培地 A, B, C のトリグリセリドの全脂質

に占める割合は、それぞれ95.3%, 97.7%, 96.2%であった。

【0068】

実施例5. 脂質含有組成物を菌体外に分泌する菌Mortierella alpina SAM2241

の10Lバイオリアクターによる連続培養

セラミックフィルター2本を内臓した10Lバイオリアクターに、グルコース2%、酵母エキス2%含有しpHを7に調整した培地5Lを調製し、実施例1で得たモルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) SAM2241 を前培養した菌株を植菌して通気攪拌を行った。翌日さらに培地内グルコース濃度が3%増加するようにセラミックフィルターを通じてグルコース溶液を添加した。2日目にも同様に培地内グルコース濃度が3%増加するようにセラミックフィルターを通じてグルコース溶液を添加した。

【0069】

3日目以降、5%グルコース、0.05%酵母エキス溶液を約1000ml/日の速度でセラミックフィルターを通じて連続的に流加した。そして約600ml/日(液量変動しないよう調整する)でセラミックフィルターから培養液を連続的に抜き出した。フィルターが菌体で目づまりするのを防ぐため、グルコース、酵母エキス溶液の供給と培地の抜き出しを適宜交互に入れ替えた。通気による水分の蒸発があるためジャー内液量はほぼ一定に保たれた。また、グルコースの流加濃度は抜き出すグルコース濃度により調節した。この結果培養10日間にわたって、アラキドン酸を含有したトリグリセリドを約1g/L含有した培地(培養液)を連続的に取り出すことができた。

【0070】

実施例6. 培地に添加した油脂の微生物変換と、脂質含有組成物を菌体外に分

泌する菌Mortierella alpina SAM2241による脂質含有組成物への移

行

グルコース1%および酵母エキス1%を含む培地(pH 6.0)2mlに亜麻仁油または魚油を2%添加し、10mlのエrlenmeyerフラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。実施例1で得たモルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) SAM2241 を培地に一白金耳接種し、レシプロシェーカー(150 rpm)により、28℃で

8 日間培養した。濾過により濾液を回収し、凍結乾燥後、菌体外に分泌した脂質含有組成物中の脂質を、実施例 2 と同様にメチルエステル化を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをキャピラリーガスクロマトグラフィーで分析した。

【0071】

亜麻仁油を培地に添加した場合は、亜麻仁油の主要脂肪酸である 9, 12, 15-オクタデカトリエン酸 (α -リノレン酸) が、変異株の脂肪酸生合成系酵素の基質となり、6, 9, 12, 15-オクタデカテトラエン酸 (ステアリドン酸)、8, 11, 14, 17-エイコサテトラエン酸、5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸に変換され、高度不飽和脂肪酸含有物質の脂質に、6, 9, 12, 15-オクタデカテトラエン酸 (ステアリドン酸)、8, 11, 14, 17-エイコサテトラエン酸、5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸がそれぞれ 2.4, 3.3, 8.1% 含まれており、変換された脂肪酸がトリグリセリドの構成脂肪酸として菌体外に分泌することが確認できた。

【0072】

また、魚油を培地に添加した場合には、魚油の 5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸や 4, 7, 10, 13, 16, 19-ドコサヘキサエン酸が菌に取り込まれ、トリグリセリドの構成脂肪酸として菌体外に分泌することが、菌体外に分泌した脂質含有組成物中の脂質に 5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸や 4, 7, 10, 13, 16, 19-ドコサヘキサエン酸が 8.1, 12.2% 含まれていたことから確認できた。

【0073】

実施例 7. *Mortierella alpina* SAM2241 が菌体外に分泌する脂質含有組成物の分析

菌体外に分泌した脂質含有組成物の成分分析を行うために、実施例 1 で得たモルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) SAM2241 の胞子液を GY 寒天プレート (1% グルコース、0.5% 酵母エキス、0.005% トリトン (Triton) X-100、1.5% 寒天、pH 6.0) に塗布し、28℃ で 4 日間培養した。

【0074】

実施例 1 で示したのと同じように、コロニー全体が小胞 (Lipid ball) で覆わ

れていた。そこで、その小胞をネジ口試験管 (16.5mmφ) に集めた。そして、クロロホルム 2ml と KCl 溶液 2ml を加えて攪拌、抽出した。クロロホルム層には脂質が、KCl 溶液層には糖質及びタンパク質が移行し、常法にしたがって成分分析を行った結果、糖質：38.1%、タンパク質：18.2%、脂質：43.7% であった。

【0075】

実施例 8. 脂質含有組成物を使用した調製乳の調製

実施例 3 で得られた脂質含有組成物を、1500 x g の遠心で沈殿させ、滅菌水で洗浄して、食用に適した脂質含有組成物を調製した。この組成物を、粉乳 100 g に 0.92 g 添加することにより、脂質含有組成物を含む調製乳を調製した。得られた調製乳中のアラキドン酸の組成は、全脂肪酸の 0.5% であり、これは母乳の組成に類似していた。

また、得られた調製乳を水に溶解した場合、水への分散性は極めて良好で、均一に分散し、油分が分離することはなかった。

【0076】

実施例 9. カプセル剤の調製

ゼラチン 100 重量部及び食添グリセリン 35 重量部に水を加え 50-60℃ で溶解し、粘度 20000cps のゼラチン皮膜を調製した。次に実施例 3 で得た脂質含有物質から常法に従って脂質を抽出・精製した。そして、精製油 97%、ビタミン E 油 3% を混合し、内容物を調製した。これらを用いて、常法によりカプセル成型及び乾燥を行い、1 粒あたり 180mg の内容物を含有するソフトカプセルを製造した。

【0077】

実施例 10. 脂質含有組成物を含む飲料の調製

オレンジジュース 10L に、実施例 8 に示す方法で得た、食用に適した脂質含有組成物 10g を添加することにより、脂質含有組成物を含むジュースを調製した。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする脂質を産生し、かつ産生した脂質を菌体外に分泌する特徴を有する微生物、及び当該微生物をスクリーニングする方法、ならびに当該微生物を用いて高度不飽和脂肪酸を含有する脂質を効率よく製造する方法を提供する。

【解決手段】 変異処理を施した微生物を固体培地で生育させコロニーの周りに小胞 (lipid ball) を形成する菌株および／または透明な液体培地を用いた培養で培養液に濁りが生じる菌株を選抜する。得られた微生物を培養し、培養液中に分泌された脂質含有組成物を培養液とともに回収し、脂質を分離・精製する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001904]

1. 変更年月日 1990年 8月13日
[変更理由] 新規登録
住 所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
氏 名 サントリー株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)